

## 九州工業大学学術機関リポジトリ



Title	ウシガエル味神経応答に対する浸透圧の効果 - 浸透圧効果の時間依存性とタイトジャンクションの物質透過性 -
Author(s)	増山, 和典
Issue Date	2014-03-25
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10228/5252">http://hdl.handle.net/10228/5252</a>
Rights	

氏 名	増山 和典( 栃木県 )		
学 位 の 種 類	博 士( 工学 )		
学 位 記 番 号	生工博甲第221号		
学位授与の日付	平成26年3月25日		
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当		
学 位 論 文 題 目	ウシガエル味神経応答に対する浸透圧の効果 —浸透圧効果の時間依存性とタイトジャンクションの物質透過性—		
論文審査委員会	委員長	教 授	古川 徹生
		教 授	栗生 修司
		教 授	森江 隆
		教 授	夏目 季代久
		教 授	石井 和男

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

味覚は外界の化学物質を検知することから化学感覚と呼ばれる。味は、塩味、酸味、甘味、苦味、うま味の5つの基本味に分類される。これらの味情報の伝達は、味物質が味蕾細胞に存在する味物質受容体に結合することから始まる。このとき味覚受容体の外界に接する部位では、味物質濃度と浸透圧が同時に上昇する。したがって、これまで測定されてきた味応答は、味刺激と浸透圧刺激の両者に対する応答である。Beppu ら (Pflugers Arch - Eur J Physiol 463:845-851, 2012) は浸透圧による塩応答の修飾機構として次のような仮説を提出した。味蕾内の細胞間に存在するタイトジャンクションが高浸透圧溶液にさらされることによって、タイトジャンクションを介した物質透過性が増大し、舌表面と間質液に存在する陽イオンと陰イオンの移動度の差に起因する拡散電位が発生し、塩が引き起こす受容器電位を増強あるいは抑制する、というものである。

舌咽神経から記録されるウシガエルの塩刺激に対する積分味応答は、刺激直後に発生する一過性の成分とその後に続く持続性の成分から成る。もし、Beppu ら (2012) の仮説が正しければ、拡散電位は当然刺激直後の一過性成分にも影響を与えるはずである。また、浸透圧の作用は、味物質の種類に依存せず、高浸透圧に暴露した時間に依存するはずである。本研究では、塩および苦味物質の一過性応答に対する浸透圧効果の時間依存性を調べた。また、高浸透圧下でタイトジャンクションが開くかどうかということ、蛍光色素 Lucifer Yellow CH を用いて調べた。浸透圧の調整にはほとんど味応答を引き起こさない尿素、エチレングリコール、グリセロール、ソルビトールを用いた。

尿素 (1 M) を含む 500 mM NaCl を同時に舌に与えると、一過性応答にはほとんど変化が見られなかった。それに対し、持続性応答は次第に増大し、刺激し続けると徐々に減少する上に凸の応答パターンを示した。つぎに、あらかじめ 1 M 尿素を 10~30 秒間与えた後の 1 M 尿素を含む 500 mM NaCl 応答について調べた。NaCl の一過性成分は尿素を与える時間が~10 秒間と短いことはほとんど変化

しなかったが、徐々に増大し、30 秒で 1.6 倍となり、その後徐々に減少した。このため一過性応答も、あらかじめ尿素で舌上の浸透圧を上げた状態にしておくと、その尿素の処理時間に依存して変化することがわかった。このこのように一過性応答も持続性応答と同様に、浸透圧の増大によって上に凸の時間依存性を示した。エチレングリコール、グリセロール、ソルビトールを用いた実験においても同様の結果を得た。

NaCl 以外の一価塩についても調べた。あらかじめ舌表面を高浸透圧状態にする処理時間を 30 秒とすると、一過性応答は増大した。各種一価塩応答の増大の程度は、 $\text{LiCl} > \text{NaCl} > \text{NaBr} > \text{KCl} > \text{KBr}$  となり、塩を構成する陽イオンと陰イオンの移動度の差に依存した。これに対して、 $\text{CaCl}_2$  と苦味物質に対する応答は減少した。これらの高浸透圧による効果の大きさは、Goldman の式から求めた拡散電位の大きさに依存しており、一過性応答においても、Beppu ら (2012) の仮説を適用できることを証明した。

実際にタイトジャンクションのイオン透過性が増大するのかを味神経応答の記録から知ることは不可能である。そこでつぎに、高浸透圧によって舌上皮の物質透過が実際に起こっているのか、舌のスライス標本を作製し、蛍光色素ルシファーイエロー-CH(LY-CH)の浸透性を指標に検証した。

ウシガエルの舌表面に 100  $\mu\text{M}$  LY-CH を 30 秒間与えても LY の味蕾内への拡散は観察されなかった。これに対して 1.4 M 尿素 (1.4 Osm) を含む 100  $\mu\text{M}$  LY-CH を 30 秒間舌表面に与えると、LY の味蕾内への拡散が観察された。LY の蛍光強度を味蕾表面から内部に向かって測定し、味蕾表面からの距離と LY の拡散の関係を調べた。1.4 M 尿素が存在すると、蛍光強度は表面から約 15  $\mu\text{m}$  まで徐々に増大し、15~25  $\mu\text{m}$  ではほぼ一定となり、25  $\mu\text{m}$  よりも深部になると徐々に減少した。エチレングリコール、グリセロール、ソルビトールにおいても同様の結果となった。これらの結果は、高浸透圧の条件下で LY がタイトジャンクションを経て味蕾内に拡散したことを示唆する。

以上の実験結果より、次のように考えた。舌上皮が高浸透圧溶液にさらされると、舌上皮の細胞が収縮し、細胞間のタイトジャンクションが徐々に開き、物質透過性が増す。開口したタイトジャンクションに拡散電位が発生し、この拡散電位が生成する局所電流が味物質受容細胞基底膜を外向きに流れるとき、味物質が引き起こす受容器電位を増強し、味神経応答を増強する。局所電流が内向きに流れるとき、受容器電位を抑制し、味神経応答を抑制する。

増強効果が時間とともに減少するのは、浸透圧による味物質受容細胞の収縮によると考えた。すなわち、高浸透圧下では、味物質受容細胞から水分子が奪われることで細胞内 K 濃度が徐々に上昇し、この上昇に伴う過分極が増強効果を抑制する。抑制効果も、同様の機構で時間とともに増強されると考えた。

## 学位論文審査の結果の要旨

本論文は、3 章と結論、謝辞から構成される。第一章は序論であり、ウシガエル味覚器の構造と機能、タイトジャンクションの性質や役割、および先行研究など研究背景の記述である。先行研究とし

て最も重要なのは、別府ら (Beppu et al., Pflügers Arch - Eur J Physiol 463:845–851, 2012) の報告である。別府らは、浸透圧増加がウシガエル味神経応答を修飾することから、味細胞間タイトジャンクションに発生する拡散電位が味神経応答を修飾すると考え、電氣的等価回路を提案した。本論文は、この提案を念頭に、浸透圧の効果をより多様な観点から詳細に調べている。ウシガエルは、動物愛護法の対象動物ではないが、対象動物に準じて使用されていた。

第二章で、著者はウシガエル味神経応答に対する浸透圧効果の時間依存性を調べ、タイトジャンクションに生じる拡散電位により浸透圧効果が説明できることを示した。各種非電解質 (尿素、エチレングリコール、グリセロール、ソルビトール) を加えることで、浸透圧を調整した順応液に舌を順応させた後、同一の非電解質を加えた味刺激液 (無機塩類) に対する味神経応答を測定した。これら非電解質自身は、味神経応答を引き起こさないことを確認した。また、いずれの非電解質も、同濃度、すなわち同浸透圧では、同一の効果を示したことから、非電解質は浸透圧を上昇させることで、味神経応答を修飾することを確認した。

味神経応答は、過渡的な phasic 応答およびそれに続く持続的な tonic 応答から構成される。また、浸透圧効果は、味物質濃度に依存して抑制性であったり増強性であったりした。しかし、浸透圧効果の発現に要する時間が phasic 応答、tonic 応答、抑制効果、増強効果に対してすべて同じであることを示した。さらに、これまで浸透圧効果の調べられたことのない各種苦味物質 (キニーネ、パンプベリン、ストリキニーネ) に対する味神経応答も、同様の浸透圧効果を受けることを明らかにした。

著者は、これらの味神経応答に対する浸透圧効果が舌上の味刺激液と舌内部のリンパ液間に生じる拡散電位によって説明できることを示した。拡散電位は、ゴールドマンの式で求め、拡散電位が舌表面に対して負になるとき味神経応答を増強し、正になるとき抑制することを示した。本論文は、浸透圧効果が Beppu ら (2012) 結果と一致したばかりではなく、各種無機塩および苦味物質など多様な味物質に対する一過性応答、持続性応答などの味神経応答の各成分すべてに対して普遍的であることを示した。また、調べたすべての味神経応答に対する浸透圧効果が同じ時間依存性を示したことから、著者は、時間依存性は浸透圧がタイトジャンクションを開口するのに必要な時間を示すと考え、次章でタイトジャンクションの開口を測定した。

第三章で、著者は浸透圧がタイトジャンクションを開口することを証明した。味神経応答に対する浸透圧効果は、高浸透圧溶液に 30 秒間順応することで最大となった。この高浸透圧溶液に蛍光色素ルシファーイエローCHを添加し、ウシガエル舌に 30 秒間与えた後、ホルマリンで固定し、味覚器のスライス標本を作り、味盤内部へのルシファーイエローCHの拡散を蛍光顕微鏡で計測した。ルシファーイエローCHの蛍光強度は、味覚器内部へ向かうにつれて増大し、味覚器表面から～20 マイクロメートル内側で最大となり、さらに奥へ進むにつれて減少した。この分布様式は、非電解質の種類に依存しなかった。浸透圧効果を持たない低浸透圧溶液は、ルシファーイエローCHの拡散を生じなかった。結論では、著者はヒトでもウシガエルと同様の浸透圧効果があれば、食塩濃度が低くても、十分な塩味を得られる可能性を示した。

本研究は、研究の動機、実験方法、実験結果の処理、考察のいずれも理にかなっており、実験結果を理論的に説明することに成功している。

公聴会や論文調査会において、多数の質問があった。たとえば、神経インパルスの大小が神経線維の直径の大小に由来するという解剖学的な知見はあるのかという質問に対し、カエルでは味神経線維が Aδ に分類されていること、味盤内では軸索をもたないことなどを説明し、解剖学的な研究は十分ではないことを説明した。アルカリ処理が受容体に及ぼす影響についての質問に対しては、塩感受性サイトが生成する大インパルス発生頻度を増強するが、塩感受性を変化させないことを説明した。味覚器以外の表皮にルシファーイエロー CH が拡散しない理由を問われたことについては、タイトジャンクションを形成するタンパク質に多様性があることから、味盤とそれ以外の上皮ではタイトジャンクションの種類が異なる可能性を指摘した。これらの回答に対し、質問者は納得した。

以上に記した論文調査及び最終試験の結果に基づき、論文審査委員会は慎重に審査し、本論文が、博士（工学）の学位に十分値するものであると判断した。